

## **Satureja montana: evaluación como agente antifúngico en pinturas para prevención del biodeterioro**

**S. Bogdan** <sup>(1)</sup>, R. Romagnoli <sup>(2)</sup>, C. Deyá <sup>(3)</sup>

(1) Becario CONICET (2) Docente Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, Investigador CONICET

(3) Docente Facultad de Ingeniería, Investigador CONICET

CIDEPINT-Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Pinturas (CICPBA-CONICET LA PLATA). Av. 52 s/n entre 121 y 122. C.P. 1900 La Plata, Argentina.

E-mail: estelectro4@cidepint.gov.ar

**Palabras clave:** biodeterioro, pintura, antifúngico, aceite esencial, *satureja montana*

### **RESUMEN**

El biodeterioro constituye un conjunto de procesos físicos y químicos que generan alteraciones en diversos materiales. La prevención del crecimiento de mohos, así como el desarrollo de medidas de tratamiento apropiadas para los objetos contaminados, son un desafío permanente [1,2]. En este sentido, las pinturas y recubrimientos en general juegan un papel importante como sistemas de conservación y protección de los distintos objetos.

El objetivo de este trabajo de investigación fue, en una primera instancia, evaluar la actividad antifúngica in vitro del aceite esencial de *Satureja montana* (Sm) para luego incorporarlo en una formulación de pintura látex como agente biocida y evaluar su desempeño. Mediante ensayos de contacto in vitro con distintos hongos, se determinó que el aceite esencial al 0.5% v/v, inhibió completamente el crecimiento de todos los hongos. Posteriormente, se formuló una pintura al agua a la que se incorporó como aditivo biocida Sm al 2% p/p y se realizó el ensayo de bioresistencia de la película seca. Para ello, se inocularon paneles pintados con *Aspergillus sp.* y se incubaron en atmósfera de humedad controlada. Al finalizar el tiempo de incubación, se realizó una inspección visual asignando una calificación al crecimiento fúngico, según la Norma ASTM D-5590-00. Adicionalmente, se realizaron observaciones mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). La pintura con el aceite esencial mostró una inhibición significativa del crecimiento fúngico sobre la película seca.

### **INTRODUCCIÓN**

El biodeterioro constituye un conjunto de procesos físicos y químicos que generan alteraciones en diversos materiales. No sólo materiales como ladrillos, pinturas, hormigón, sino que también los objetos de arte en museos y sus depósitos son amenazados por la contaminación por hongos. La prevención del crecimiento de mohos, así como el desarrollo de medidas de tratamiento apropiadas para los objetos contaminados, son un desafío permanente [1,2]. En este sentido, las pinturas y recubrimientos en general juegan un papel importante como sistemas de conservación y protección de los distintos objetos.

Las pinturas de base acuosa son aquellas en las que el vehículo es una emulsión de la resina en agua. Al ser aplicadas, la emulsión se rompe al eliminarse el agua durante el secado, obteniéndose así una fase oleosa continua. En las formulaciones de este tipo de pinturas se han quitado los solventes orgánicos, reduciéndose así la emisión de estos compuestos y, por ende, la contaminación ambiental. La desventaja de estas pinturas es el gran contenido de aditivos que requieren para su formulación: espesantes (en su mayoría a base de celulosa), emulsionantes, plastificantes, etc.. Todos los aditivos son susceptibles de biodeterioro [3-5]. Los aditivos convencionales utilizados como biocidas en pinturas y recubrimientos suelen ser tóxicos, produciendo contaminación ambiental y problemas en la salud [6,7]. Una alternativa “ecoamigable” para su reemplazo podría ser la utilización de productos naturales, como ser los aceites esenciales.

Los aceites esenciales (AE) son una mezcla compleja de compuestos naturales caracterizados por un fuerte aroma, que se acumulan como metabolitos secundarios en las distintas partes de las plantas aromáticas (flores, brotes, hojas, frutos, tallos, ramas, corteza, semillas, madera y raíces) [8]. El porcentaje de los componentes de los aceites varía entre especies, partes de la planta, estación y condiciones de cosecha, ubicación geográfica, entre otros. Según su estructura química, los componentes de los AE son, principalmente, terpenos y terpenoides y sus derivados oxigenados. Se pueden obtener por extracción, fermentación o extracción pero la destilación es el método más comúnmente utilizado [9]. Se vienen utilizando desde tiempos antiguos por sus propiedades antisépticas, por su fragancia, para la preservación de los alimentos y como antimicrobianos, analgésicos, entre otros [8]. Es difícil correlacionar la actividad antimicrobiana a compuestos individuales o clases de compuestos presentes en el aceite, es posible que los efectos sean el resultado de muchos compuestos que actúan sinérgicamente [10].

El objetivo de este trabajo de investigación fue, en una primera instancia, evaluar la actividad antifúngica in vitro del aceite esencial de *Satureja montana* (ajedrea) para luego incorporarlo en una formulación de pintura látex como agente biocida y evaluar su desempeño.

## **MATERIALES Y METODOLOGIA**

### **Aceite esencial**

El aceite esencial puro (sin ningún tipo de agregado de químicos sintéticos) de *Satureja montana* (Sm) fue provisto por la Cátedra de Fitoquímica, de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Plata. El aceite se almacenó a 4°C hasta su uso.

### **Aislamientos fúngicos y medios de cultivo**

Los aislamientos fúngicos utilizados (*Alternaria alternata*, *Chaetomium globosum*, *Mucor sp.*, *Aspergillus sp.*) fueron previamente obtenidos de películas de pinturas contaminadas. Los hongos fueron cultivados en medio de cultivo agarizado (MCA) de la siguiente composición: 1,5g agar-agar, 1,0g dextrosa, 0,5g proteasa peptona, 0,1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05g MgSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O destilada hasta completar 100 mL. Se incubaron en estufa a 28°C, entre 7-13 días, dependiendo de la especie fúngica.

La suspensión de esporas de *Aspergillus sp.*, para realizar los ensayos sobre sustratos pintados, fue preparada a partir de un cultivo en MCA, en las condiciones antes mencionadas. Las esporas fueron removidas de las placas y depositadas en frascos con 5

mL de una solución de NaCl 0,85% p/v y Tween-20 0,005% p/v. La concentración de esporas fue ajustada a  $10^6$  esporas/mL utilizando una cámara de Neubauer.

### Actividad antifúngica in vitro

Se realizó a través de un ensayo de contacto con los hongos *Alternaria alternata*, *Chaetomium globosum*, *Mucor sp.* y *Aspergillus sp.*. Se autoclavó el medio de cultivo MCA fraccionado, en frascos con 15 ml cada uno, y se colocaron en baño termostático a 60°C. Una vez termostatizado, se le incorporó el aceite esencial hasta una concentración final de 1%v/v de Sm, se homogenizó y se vertió sobre una placa de Petri. Luego, se inoculó con un “taco” de 7mm x 7mm del hongo crecido previamente en medio MCA. Como control se utilizó MCA sin aceite esencial. Finalmente las placas fueron incubadas a 28°C por 7-13 días, dependiendo de la especie. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Para calcular el efecto inhibitorio se utilizó la siguiente fórmula:  $I = [(C-E)/C] \times 100$

Donde I es el porcentaje de inhibición, C es el diámetro del crecimiento radial del hongo en el control y E es el crecimiento radial del hongo en el medio con aceite esencial. El diámetro de crecimiento se obtuvo como el promedio de tres medidas independientes.

### Formulación y elaboración de la pintura

Se formuló una pintura acrílica al agua, sin ningún tipo de biocida, cuya composición se presenta en la Tabla 1. Se elaboró en una dispersora de alta velocidad. Una vez finalizada, se fraccionó de modo de dejar una parte para utilizar como pintura control, sin biocida, y otra fracción se le incorporó Sm al 2% p/p. Se conservaron en frascos cerrados a temperatura ambiente hasta su uso.

Tabla 1: Composición de la pintura

Componente	% (p/p)
Agua (solvente)	25,2
Antiespuma	0,3
Espesante (celulósico)	0,5
Dispersantes	0,45
Humectante	0,15
TiO <sub>2</sub> (Pigmento opacante)	19,0
CaCO <sub>3</sub> natural (Pigmento carga)	41,6
CaCO <sub>3</sub> precipitado (Pigmento extendedor)	3,7
Resina acrílica estirenada	7,2
Aguarrás (Coalescente insoluble)	1,3
Butilglicol (Coalescente soluble)	0,6

### Ensayo de bioresistencia al ataque fúngico sobre película seca de pintura

Se aplicaron dos manos de pintura sobre paneles de yeso de 2,5cm x 2,5cm. Se dejaron secar a temperatura ambiente durante 15 días (curado). Pasado ese tiempo, se esterilizaron con luz UV durante 20 minutos y, luego, se colocaron en placas de Petri conteniendo papel de filtro con 1 mL de agua estéril, para generar una atmósfera húmeda. Se inoculó cada panel con 100 µL de la suspensión de esporas de *Aspergillus sp.* Se incubaron en atmósfera controlada 86% HR durante 1 mes. Se ensayaron los paneles por sextuplicado. La elección de *Aspergillus sp.* para este ensayo se debe, principalmente a que se encuentra dentro de los colonizadores primarios por sus bajos requerimientos de actividad de agua sobre los sustratos, su rápido crecimiento, fácil visualización y mayor resistencia a los biocidas [11, 12].

El crecimiento del hongo fue estimado como porcentaje de cobertura sobre la superficie. Los paneles se calificaron según lo indica la Norma ASTM D-5590-00 [13] (Tabla 2). Adicionalmente se realizaron observaciones de los paneles en microscopio electrónico de barrido (MEB). Para ello se fijaron las muestras con glutaraldehído al 2,5% v/v (24 h) y se deshidrataron con soluciones graduales de etanol desde 20% v/v a 100% v/v (30 min cada una). Posteriormente se les efectuó secado por punto crítico y finalmente metalizado con oro. Se realizaron las observaciones en un microscopio electrónico FEI, modelo Quanta200, modo alto vacío, 5-12,5 kV.

Tabla 2: Calificación del crecimiento fúngico en placa

Observación del crecimiento	Calificación
Sin crecimiento	0
Crecimiento en trazas (<10%)	1
Crecimiento bajo (10-30%)	2
Crecimiento moderado (30-70%)	3
Crecimiento alto (70% hasta cobertura completa)	4

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los ensayos de actividad antifúngica in vitro se muestran en la Figura 1. Éstos fueron muy favorables, dado que el aceite esencial de Sm logró inhibir completamente el crecimiento de todos los hongos ensayados (*Alternaria alternata*, *Chaetomium globosum*, *Mucor sp.* y *Aspergillus sp.*).

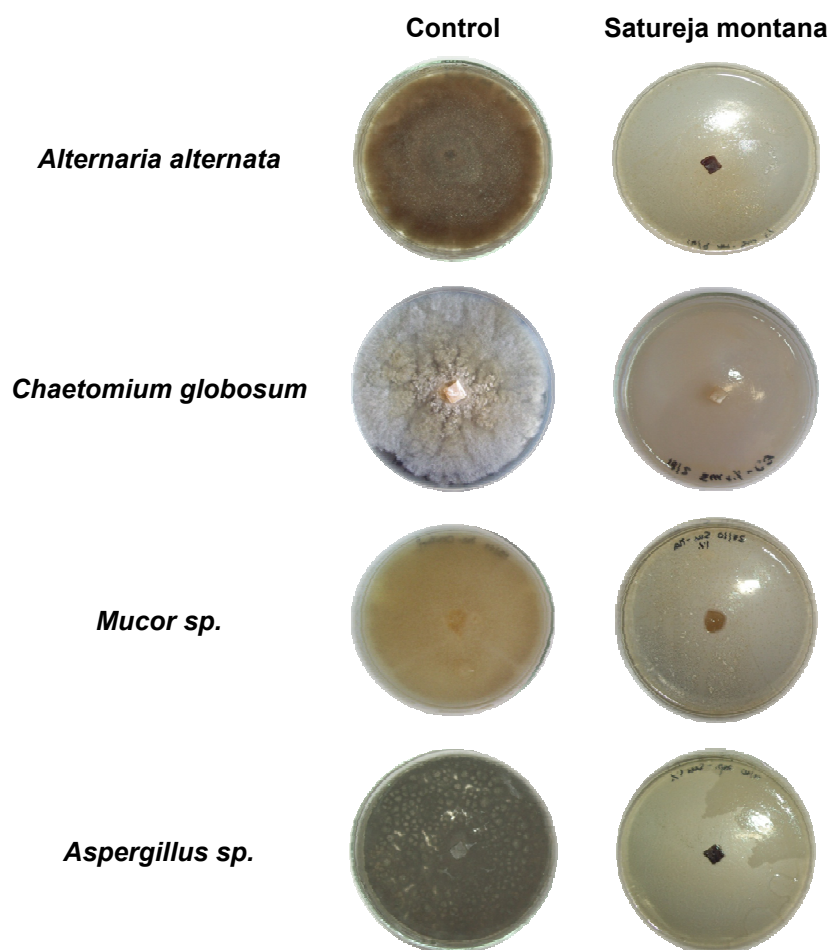


Figura 1: Ensayos de actividad antifúngica in vitro

Los resultados obtenidos para los ensayos de bioresistencia al ataque fúngico sobre película seca de pintura fueron promisorios. La calificación obtenida, según la norma, para la pintura control fue de 4 puntos, la mayor calificación, lo que indica un grado de cobertura de la superficie pintada, por el hongo crecido, mayor al 70%. La Figura 2 muestra algunas de las imágenes obtenidas por MEB para la pintura control. En la Figura 2-A se observa claramente la colonización fúngica, incluso se dificulta visualizar la superficie de base (pintura) por el abundante desarrollo del micelio. En la Figura 2-B se visualiza el colapso de la estructura del recubrimiento y las hifas penetrando en el interior del mismo. Este daño mecánico pudo haber sido ocasionado por la presión ejercida por las hifas durante el crecimiento (daño físico).

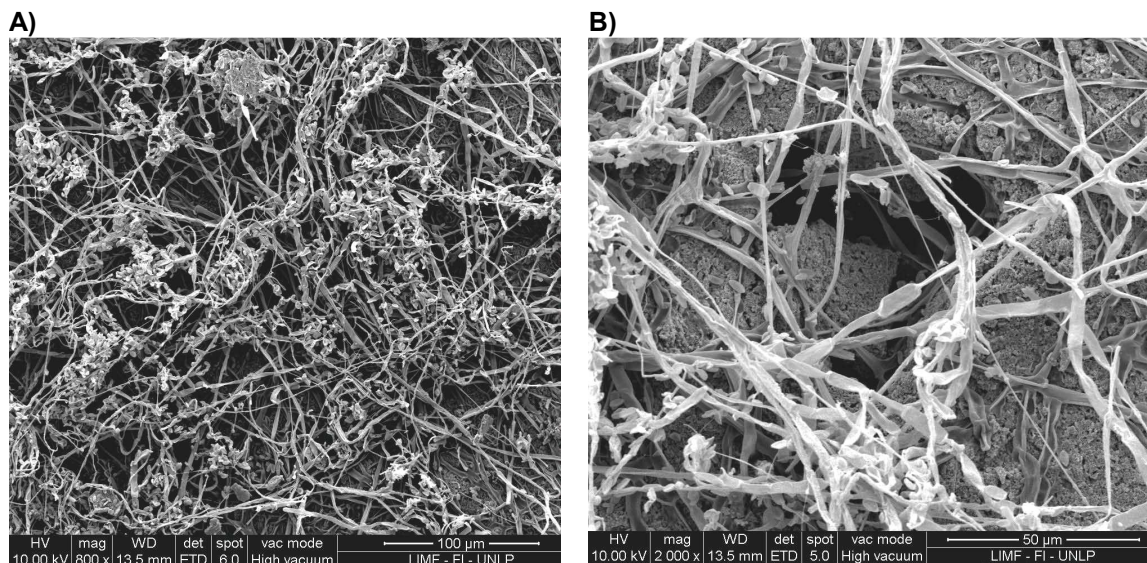


Figura 2 - Micrografías MEB de los paneles pintados con la pintura control (sin biocida)

Para la pintura con Sm, la calificación fue de 2 puntos, indicando una cobertura tan solo de entre 10-30% de la superficie de la pintura. Respecto del control, la reducción del crecimiento de *Aspergillus sp.* fue muy significativa mostrando que el aceite esencial de Sm ejerce una inhibición del crecimiento fúngico sobre la película seca (Figura 3).

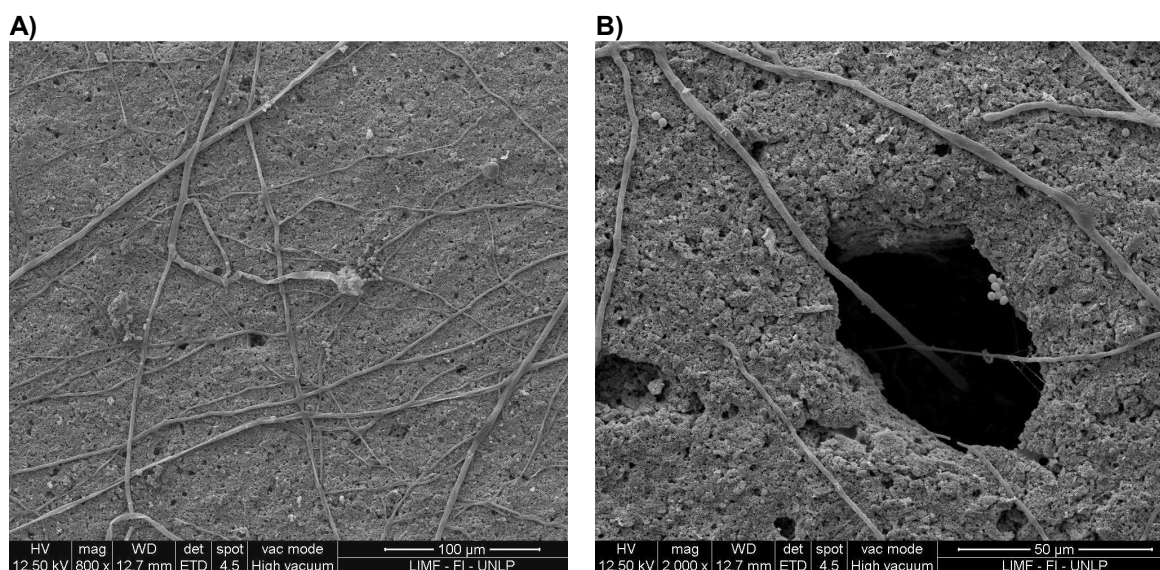


Figura 3 - Micrografías MEB de los paneles con la pintura Sm



## CONCLUSIONES

El aceite esencial de ajedrea logró inhibir completamente el crecimiento de todos los hongos en los ensayos en placa. Para los ensayos en pintura se observó una reducción significativa del crecimiento sobre la película seca por acción del aceite. Dado que las pinturas son un sistema complejo de componentes y, a su vez, los aceites son compuestos volátiles es muy probable que parte de los mismos no estén disponibles debido a interacciones con algún (o algunos) componente de la resina o debido a su evaporación. En investigaciones futuras se podrían evaluar distintos sistemas de encapsulación de los aceites a fin de reducir la pérdida del mismo y disminuir la interacción con el resto de los componentes de la pintura, de manera que queden disponibles, únicamente, como biocidas.

Este tipo de recubrimientos poseen buen potencial, puesto que los aceites esenciales son un recurso natural, renovable y ecoamigable. Un inconveniente, en este momento, es el costo de las materias primas. Los costos resultan elevados cuando el proceso se considera para la producción en masa, pero podrían ser aceptables si se los considera para aplicaciones especiales o aquellos casos en los que falla la tecnología convencional. Es necesario seguir investigando y trabajar en conjunto con empresas, para hacer viable la selección de ideas, tecnologías y compuestos “ecoamigables” para la generación de productos comerciales.

## REFERENCIAS

- [1] Sterflinger K., Fungi: their role in deterioration of cultural heritage, *Fungal Biology reviews*, 24 (2010), p.47-55.
- [2] Griffin P. S., Indictor N., Koestler R. J., The biodeterioration of Stone: a review of deterioration mechanisms, conservation case histories, and treatment, *International Biodeterioration*, 28 (1991) p.187-207
- [3] P.S. Guimet, H.A. Videla, Microbiological spoilage of aqueous based surface coatings, *Corrosion Reviews* 14 (1996) p. 47-58.
- [4] A. M. Rhoades, A. W. Douglas, M. Bruhaspathy, J. Williamson, Interactions of an antimicrobial peptide (Ac-RRWWRF-NH<sub>2</sub>) and surfactants: Towards antimicrobial peptide additives for coatings applications, *Progress in Organic Coatings* 58 (2007) p. 209-216.
- [5] A. F. Bravery (1988), “Biodeterioration of Paint-a State-of-the-Art Comment”, En: D. R. Houghton, R. N. Smith, H. O. W. Eiggins (Eds.): *Biodeterioration* 7, p. 466-485.
- [6] Hare C., Microbiologically-influenced attack of coatings, *JPCL*, 2000, p.51-65.
- [7] Johns K., Hygienic coatings: the next generation, *Surface Coatings International*, 86 (2003) p.101-110.
- [8] Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M., Biological effects of essential oils - A review, *Food and Chemical Toxicology* 46 (2008) p. 446–475.
- [9] Solorzano-Santos F. and Miranda-Novales M. G., Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents, *Current Opinion in Biotechnology*, 23 (2012) 136–141
- [10] Feng W., Zheng X., Essential oils to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo, *Food Control*, 18 (2007) p. 1126–1130
- [11] Li D., Yang C.S., Fungal contamination as a major contributor to sick building syndrome, *Adv. Applied Microb.*, 55 (2004) p. 31-96.
- [12] Nielsen K.F., Mould growth on building materials. Secondary metabolites, mycotoxins and biomarkers, PhD. Thesis (2002)
- [13] ASTM D5590-00, “Standard Test Method for Determining the Resistance of Paint Films and Related Coatings to Fungal Defacement by Accelerated Four-Week Agar Plate Assay”, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2010.